

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-123392
(43)Date of publication of application : 27.05.1988

(51)Int.Cl. C12P 19/26
C12P 19/04

(21)Application number : 61-269734 (71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK
(22)Date of filing : 14.11.1986 (72)Inventor : HASHIMOTO MASAMICHI
SAEGUSA HARUHISA
CHIBA SUSUMU
KITAGAWA HIROYUKI
MIYOSHI TERUZO

(54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce hyaluronic acid in high yield, stably and in uniform yield, by cultivating a bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, from which nutrition demanding properties are partially removed, in a nutritive medium.

CONSTITUTION: *Streptococcus equi* ATCC9527 is cultivated in a medium containing polypeptone, yeast essence and glucose, the cell in a logarithmic proliferation period is collected, washed and treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine to give *Streptococcus equi* FM100 (FERM-P 9027) from which nutrition demanding properties are partially removed and which can grow in an artificial synthetic medium consisting only of a medium component in which ATCC strain, parent strain, can not grow. the strain is subjected to aerated spinner culture in a nutritive medium containing a carbon source, a nitrogen source, inorganic salt, etc., and, if necessary, amino acid, vitamin, etc., at pH6.5W7 at 30W35° C to give hyalunonic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-123392

⑫ Int.Cl.
C 12 P 19/26
19/04識別記号 厅内整理番号
8515-4B
A-8515-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月27日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ヒアルロン酸の製造方法

⑮ 特願 昭61-269734

⑯ 出願 昭61(1986)11月14日

⑰ 発明者 橋本 正道 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内⑰ 発明者 三枝 治久 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内⑰ 発明者 千葉 晋 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内⑰ 発明者 北川 広進 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内⑰ 発明者 三好 照三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社
中央研究所内

⑰ 出願人 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

明細書

1 発明の名称

ヒアルロン酸の製造方法

2 審査請求の範囲

- (1) 栄養要求性が部分的に除去されたストレプトコクカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成させしめるなどを特徴とする製造法によるヒアルロン酸の製造法。
- (2) 球状の増殖しない表1に示す培地成分から成る人工合成培地に生育できる栄養要求性が部分的に除去されたストレプトコクカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成させしめるなどを特徴とする製造法によるヒアルロン酸の製造法。

特開昭63-123392(2)

培地成分	培地成分
グルコース	アラニン グアコン
レーアルギニン	ウラシル
レーアスパラギン	D,L-ペプチドテン酸カルシウム
ローアスパラギン酸	リボフリビン
レーアスパラギン酸	チアミン
レーアスパラギン酸	ナイアシン
レーグルタミン酸	ビリジンキサン
レーグルタミン酸	ビリジドキサール
グリシン	塩酸
レーピスチジン	ビオチン
レーピロリシン	パラアミノ安息香酸
レーロイシン	NAD
レーリシン	K ₃ HPO ₄
レーメチオニン	KH ₄ PO ₄
レーフェニカルアラニン	MgSO ₄ ·7H ₂ O
レープロリン	FeSO ₄ ·7H ₂ O
ローセリン	MnSO ₄ ·4H ₂ O
ローバレオニン	NaCl
ローテリファン	NaC ₆ H ₅ O ₂ ·3H ₂ O*
ローネオロジン	NaHCO ₃
ローベリン	CaCO ₃ ·2H ₂ O

* 培養ソース

3.発明の詳細な説明

【発明上の利用分野】

本発明は、醸造法によるヒアルロン酸の製造法に関する。さらに詳しくは、栄養要求性が部分的に解消されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成収穫せしめることを特徴とするヒアルロン酸の製造法に関する。

【従来の技術】

従来ヒアルロン酸はニクトリのトサカ、牛の喉の角子体又は臍帯等より抽出によつて得られていた。しかしながら抽出法によるヒアルロン酸製造は、分離精製が非常に困難等の欠点を有していた。

その欠点を改良するために、ヒアルロン酸を生成する能力を有する微生物を培養し、その培養液から直接ヒアルロン酸を採取する方法が開示されている(特開昭58-56692号公報、特開昭61-63294号公報)。

さらに、微生物を培養し、ヒアルロン酸を採取する方法について、培養のロットごと生成量を安定化させるため、突然変異株を用いる方法が開示

されている(特開昭61-219394号公報)。

本発明者らは、ヒアルロン酸生成細胞を有するストレプトコッカス属の微生物を、培養液のpH 7.5~9.0にコントロールすることにより、高分子量のヒアルロン酸を生成収穫せしめる方法についてすでに提案した(特願昭61-170943号明細書)。

【発明が解決しようとする問題点】

該生物を培養して、ヒアルロン酸の生産を行なうと、ロットごとの生産量が不安定であり、工業的に実施する段階に、大きな問題となる。

【問題点を解決するための手段】

本発明者らは、かかる問題を解決すべく、種々研究を行なつた結果、栄養要求性が部分的に解消されたストレプトコッカス・エキが意外にも収穫よりも、高収量で、しかも収量のバラつきが少なく安定してヒアルロン酸を生成することを見い出し本発明を完成するに至つた。

すなわち本発明は、栄養要求性が部分的に解消されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒア

特開昭63-123392(3)

ルロン酸を生成させしめることを特徴とする培養法によるヒアルロン酸の製造法である。

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコクカス・エキスは、ヒアルロン酸生成能を有するストレプトコクカス・エキスの突然変異株の中から得することが出来る。

例えば、ストレプトコクカス・エキス ATCC9527 を用い、ポリペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2% の培地にて、33℃で培養し、対数増殖期の菌を、低速で遠心分離により集団し、生理食塩水を用いて、無菌的に 3 回洗浄する。 N-アセチル-β-D-ガラクトロ-β-D-ニトロソグアニジン 50 μg/ml を含む 5.0、0.05M リン酸緩衝液中、30℃で 1 時間過濾したのち、水冷する。ついで、生理食塩水を用いて、低速で菌体を 3 回洗浄した後、ポリペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2% の培地で、33℃、3 時間培養し、また生理食塩水を用いて、低速で菌体を 3 回洗浄する。表 2 に示す人工合成培地で、

33℃、7 日間液体培養し、増殖してきた培養液をさらに、新しい同じ人工合成培地にうえつぎ、この操作を 3 回くりかえす。

次に寒天を含む同じ組成の培地上に播布し、コロニーを分離し、ストレプトコクカス・エキス M 100 を得る。

本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、竣工研磨密第 9027 号として受託されている。ストレプトコクカス M・100 は、部分的に栄養要求性が解除され、粗株である ATCC 9527 が生育できない表 2 に示す培地成分だけからなる人工合成培地によく生育することができる。

表 2

培地成分	濃度 (μg/L)	培地成分	濃度 (μg/L)
グルコース	10000	D・L-バントテン酸カルシウム	0.5
L-アラニン	200	リボフラビン	0.5
L-アルギニン	200	チアミン	0.5
L-アスパラギン	200	ナイアシン	1.0
L-アスパラゲン酸	200	ビドキサミン	1.0
L-システィン	100	ビドキサーベ	1.0
L-グルタミン	350	葉酸	0.005
L-グルタミン酸	1000	ビオチン	0.0025
グリシン	400	パラアミノ安息香酸	0.1
L-ヒスチジン	400	NAD	0.5
L-ヒドロキシプロリン	50	K ₃ HPo ₄	500
L-イソロイシン	200	KH ₂ PO ₄	14000
L-ロイシン	200	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
L-リジン	200	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
L-メチオニン	200	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
L-フェニルアラニン	200	NaCl	10
L-プロリン	200	NaC ₆ H ₅ O ₄ ·3H ₂ O(鉛錠ソーダ)	10000
L-セリン	200	NaHCO ₃	500
L-スレオニン	200	CaCO ₃ ·2H ₂ O	60
L-トリプトファン	200		
L-チロシン	200		
L-バリン	200		
アラニン	20		
グアニン	20		
ウツル	20		

特開昭63-123392(4)

ストレプトコツカス・エキドム・100の栄養要求性は表3に示すとおりである。

供試菌	培養基		供試菌	培養基	
	有	無		有	無
L-アラニン	なし	し-メチオニン、 L-アルギニン、 L-アスパラギン酸	あり	リボフラビン チアミン	あり
L-システィン	あり	L-アスパラギン酸	なし	ナイアシン	なし
L-グルタミン	あり	L-プロリジン	あり	ビリドキサミン	なし
L-グルタミン酸	なし	L-チロシン	あり	ビリドキナール	なし
グリシン	なし	L-トリプトファン	あり	ビオチン	なし
L-ヒスチジン	あり	L-バリン	あり	ペアラミノノ酸脱氶酶	なし
L-イソロイシン	あり	アスコルビン酸	あり	NAAD	なし
L-リジン	あり	オルニチン	なし		

特定の栄養素の要求性が解消された菌株を取得するときは、表2の培地から、その栄養素を除いた培地を作成し、上述と同様の操作を行なう。

また栄養要求性が部分的に解消された菌株は、とくに人为的に変異処理を行なわなくても、上述のようなうえつぎ操作をくりかえすことにより得ることもできる。

本発明に用いる培地は通常の微生物の培養に用いるものでなく、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シューカロース、等の炭素源、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、亜硝酸ソーダ、チオ硫酸ソーダ、リン酸アンモニウム等の無機塩類、ポリペプトン、カゼミノ酸、酵母エキス、コーンステイプルガー、大豆加水分解液等の有機栄養源の他、必要に応じて各種アミノ酸、ビタミン類等が好適に用いられる。

これらの培地成分は一括仕込又は分別添加いずれでも採用可能である。

本発明の培養は、通気・搅拌培養槽の公知の方

法でよく、培養温度は30～35℃が好ましい。

培養液の出は、菌の生育と共に低下するため、カゼミノ酸、カゼカリ、アンモニア等の出調整剤を添加し、出6.5～7.0にコントロールする。

このようにして培養すると、ヒアルロン酸の生成と共に、培養液の粘度が次第に上昇してくる。使用炭素源が培養液中で消費された時点で培養を停止し、遠心分離による除菌後、アルコール等の有機溶媒による析出、紫外線による脱塩等の簡単な公知精製法により、高収率でヒアルロン酸が得られる。

【実施例】

次に実施例により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

グルコース2%、リン酸第1カリウム0.2%、硫酸マグネシウム7水塩0.05%、チオ硫酸ソーダ0.1%、ポリペプトン1.0%酵母エキス0.5%からなる出8.5の培養液1Lに同一培地からなるストレプトコツカス・エキドム・100の菌液を

特開昭63-123392 (5)

板10枚を発酵し、通気量1.5vvm、攪拌200回転/分、温度33℃でカセソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、15時間後に、グルコース2%を分離し、グルコースが全部消費された時点を培養を停止した。

培養液を培養で出4に調整後、滅菌水で2倍希釈し、遠心分離により除菌した。得られた除菌液をエチルアルコールを加え、ヒアルロン酸ソーダを析出せしめる。これをろ別した後、水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿をろり出し、2%食塩水に再溶解後、再びエチルアルコールによる析出をくり返す。得られたヒアルロン酸ソーダを滅菌で減圧乾燥して、培養液1mlあたり7.2gの白色ヒアルロン酸ソーダを得た。得られたヒアルロン酸ソーダは、赤外線吸収スペクトル、C-13核磁気共鳴スペクトル、ストレプトマイセスのヒアルロニダーゼによる分解実験でヒアルロン酸ソーダであることが確認された。上記と同様の培養を4回くりかえし、全部で5バッチ行なった結果を表すに示す。

表 3

バッチ数	収量g(培養液1mlあたり)
1	7.2
2	7.1
3	7.0
4	7.3
5	7.1

さらに長期的に培養を行なつたが、ヒアルロン酸収量は常に安定していた。

比較例1

親株であるストレプトコッカス・エキATCC9527を実験例1と同様にして、5回くりかえしたが、得られたヒアルロン酸ソーダはそれぞれ、4.5g、2.3g、3.5g、1.2g、3.9gであり、収量は実験例1に比較して、低く、またばらついていた。

〔発明の効果〕

本発明によれば、ヒアルロン酸を高収率で、しかも収量にはらつきなく、安定に生産することが

できる。また菌体自体も容易である。

本発明によつて製造されたヒアルロン酸は、化粧品、医薬品に配合して使用できる。